

## OBTENÇÃO DE EXPLANTES DE MELOEIRO (*Cucumis melo* L. cv. Gaúcho) COM ELEVADO POTENCIAL DE MULTIPLICAÇÃO

**CASTRO, Rodrigo Inacio<sup>1</sup>; PEREIRA, Wallace<sup>1</sup>; KLAFKE, Baracy Gabriel<sup>1</sup>;  
NORA, Fabiana Roos<sup>1</sup>; PETERS, José Antônio<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia-CenBiot, Universidade Federal de Pelotas-UFPel. e-mail:  
Fabiana.nora@gmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas – Departamento de Botânica. Instituto de  
Biologia/UFPEL.

### 1. Introdução

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma Cucurbitácea proveniente da Ásia tropical. De maneira geral, os melões são enquadrados como frutos climatéricos, altamente perecíveis, com uma vida de prateleira de 4 a 10 dias, dependendo da cultivar, das condições de cultivo e do ponto de colheita. Assim, um dos graves problemas é a rápida deterioração do fruto principalmente devido ao acelerado metabolismo determinado pela elevada produção de etileno (hormônio do amadurecimento) (PECH et al. 2008, Zheng et al. 2000, Fernández-Trujillo et al, 2008). Para contornar estas dificuldades, a associação de técnicas bioquímicas, moleculares e de cultura *in vitro* de tecidos vegetais, permite a manipulação genética de plantas buscando o controle da expressão de genes envolvidos na biossíntese do etileno (CARA et al. 2008). Porém, para a aplicação desta tecnologia é de fundamental importância a obtenção de métodos eficientes de regeneração de plantas através da cultura de tecidos. Observa-se para o meloeiro, que as respostas para a regeneração e multiplicação *in vitro* são altamente dependentes do genótipo empregado e assim, é necessário o desenvolvimento de protocolos específicos para cada cultivar, visando à otimização da resposta *in vitro*. Assim, o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um método para obtenção de explantes de meloeiro cv. Gaúcho com elevado potencial de multiplicação, adequado para transformação genética desta espécie.

### 2. Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em colaboração com o Laboratório de Cultura de Tecido de Plantas do Departamento de Botânica, UFPel, Pelotas. Os explantes utilizados para o trabalho consistiram em nós cotiledonares retirados de sementes de melão cv. Gaúcho 7 dias após a semeadura. Após o descascamento manual, as sementes foram desinfestadas através da imersão em hipoclorito de sódio 1%, durante 20 minutos, juntamente com 50 µL de detergente, seguida de três enxágües em água deionizada estéril, sob condições assépticas. Após a

desinfestação, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri, contendo 4 diferentes meios: Meio1. MS (Murashige & Skoog (1962), 30,0 g·L<sup>-1</sup> sacarose, 7,0 g·L<sup>-1</sup> agar); Meio2. MS + 0,5 mg·L<sup>-1</sup>BAP (benzilaminopurina); Meio3. MS + 1,0 mg·L<sup>-1</sup>BAP e Meio4. MS + 1,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP. Após 7 dias de cultivo, as sementes foram avaliadas quanto a frequência de germinação, crescimento e desenvolvimento das plântulas. Posteriormente, cotilédones e hipocótilos das sementes cultivadas por 7 dias nos meios de germinação 2, 3 e 4 foram removidos, e os nós cotiledonares produzidos foram utilizados como explantes para o processo de multiplicação de tecidos para a produção de múltiplos brotos. Os nós cotiledonares foram então transferidos e cultivados em meios frescos contendo diferentes concentrações de hormônios: Meio5. MS (Murashige & Skoog (1962), 30,0 g·L<sup>-1</sup> sacarose, 2,0 g·L<sup>-1</sup> gelrite) + 0,25 mg·L<sup>-1</sup>BAP + 0,3 mg·L<sup>-1</sup> ABA (ácido abscísico); Meio6. MS + 0,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 0,3 mg·L<sup>-1</sup> ABA e Meio7. MS + 0,9 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 0,3 mg·L<sup>-1</sup> ABA. Os explantes foram mantidos nos meios 5, 6 e 7 por um período de 4 semanas. Após este período, foram avaliados os diferentes tratamentos (conforme Tabela1). Três replicatas com 10 sementes por replicata foram utilizadas para cada tratamento. Todos os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 °C, 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e um fotoperíodo de 16h usando lâmpadas brancas fluorescentes.

Tabela 1. Tratamentos realizados no processo de multiplicação de tecidos para a produção de múltiplos brotos.

Tratamentos	Meios para germinação	Meios para multiplicação de tecidos
-	Meio 1 (MS)	
T1	Meio 2 (MS 0,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP)	Meio 5 (MS 0,25 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T2	Meio 2 (MS 0,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP)	Meio 6 (MS 0,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T3	Meio 2 (MS 0,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP)	Meio 7 (MS 0,9 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T4	Meio 3 (MS 1,0 mg·L <sup>-1</sup> BAP)	Meio 5 (MS 0,25 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T5	Meio 3 (MS 1,0 mg·L <sup>-1</sup> BAP)	Meio 6 (MS 0,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T6	Meio 3 (MS 1,0 mg·L <sup>-1</sup> BAP)	Meio 7 (MS 0,9 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T7	Meio 4 (MS 1,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP)	Meio 5 (MS 0,25 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T8	Meio 4 (MS 1,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP)	Meio 6 (MS 0,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)
T9	Meio 4 (MS 1,5 mg·L <sup>-1</sup> BAP)	Meio 7 (MS 0,9 mg·L <sup>-1</sup> BAP 0,3 mg·L <sup>-1</sup> ABA)

### 3. Resultados e discussão

As sementes de melão pré-tratadas com BAP, uma citocinina, germinaram em todos os meios testados (meio 1, 2, 3 e 4) no período de sete dias. Nenhuma diferença óbvia foi observada na frequência de germinação entre os diferentes meios (dado não mostrado). No entanto o crescimento e desenvolvimento das plântulas diferiram entre meios. Sementes cultivadas em meio MS geminaram normalmente (Fig. 1A). Sementes cultivadas em meio com adição de BAP germinaram de forma anormal: cotilédones expandidos, hipocótilos espessados, raízes engrossadas e curtas com nenhuma raiz secundária (Fig. 1B, C e D). Não houve a formação de calo nas plântulas intactas. Após sete dias em meio de germinação, gemas axilares e alguns primórdios foliares foram observados nos nós cotiledonares, base dos cotilédones, das plântulas cultivadas em meio adicionado de hormônios, expandiram em tamanho e se tornaram visíveis quando observados a olho nu e/ou com o auxílio de lupa. Os nós cotiledonares com produção de gemas e primórdios axilares de sementes cultivadas em MS 1,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP

apresentaram-se, de uma maneira geral maiores do que aqueles de sementes cultivadas em MS 1,0 mg·L<sup>-1</sup> BAP ou 0,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP. Neste estágio, os cotilédones e hipocótilos foram removidos e os nós cotiledonares foram utilizados como explantes e transferidos para os meios de multiplicação de tecidos para a produção de múltiplos brotos (Fig.1 E e F).

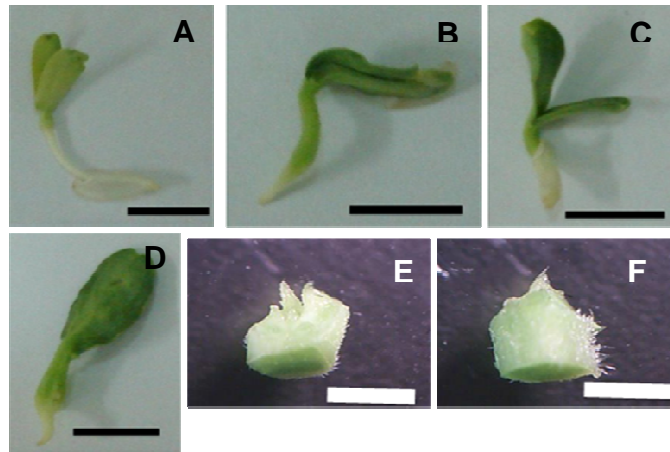


Figura1. A – Semente cultivada por 7 dias em meio 1. B – Semente cultivada por 7 dias em meio 2. C – Semente cultivada por 7 dias em meio 3. D – Semente cultivada por 7 dias em meio 4. E – Nó cotiledonar de semente cultivada por 7 dias em meio 3. F – Nó cotiledonar de semente cultivada por 7 dias em meio 4. A a D (Barra 1cm). E e F (Barra 0,3mm).

Nós cotiledonares submetidos ao tratamento 1 não apresentaram mudanças na indução de brotos laterais e morfologia nas 4 semanas de cultivo, produzindo uma única brotação apical (constituindo dominância apical) com crescimento aparentemente normal (Fig.2 A). Quando submetidos ao tratamento 2, produziram uma única brotação porém de menor tamanho, apresentando assim, de forma geral, uma menor dominância apical quando comparado ao tratamento anterior. Explantes apresentaram início de multiplicação lateral na base da brotação principal e, em alguns explantes a brotação principal apresentou o engrossamento do hipocótilo. Adicionalmente, se observou a formação de calos na base destas brotações (Fig.2 B). Quando submetidos ao tratamento 3, a brotação apical formada foi menor quando comparado aos tratamentos anteriores, ainda sendo observada a presença de dominância apical com alguma multiplicação lateral e basal, assim como a formação de calos (Fig.2 C). Nós cotiledonares submetidos ao tratamento 4 também não apresentaram mudanças na indução de brotos laterais e morfologia no período de 4 semanas de cultivo, produzindo uma única brotação, apresentando dominância apical, conforme se observou no experimento anterior, apesar de uma brotação principal de tamanho menor. Adicionalmente se observou uma maior formação de raízes e produção de calos na base da brotação (Fig.2 D). Nós cotiledonares submetidos ao tratamento 7 apresentaram uma menor dominância apical, de tamanho menor porém, sem a indução de brotações laterais (Fig.2 E). No entanto, quando eles foram submetidos ao tratamento 8, produziram um maior número de brotações laterais com certo alongamento das mesmas (Fig.2 F). Quando submetidos ao tratamento 9 houve uma maior indução de gemas e brotos laterais mostrando-se pouco alongados e com alguma ou nenhuma dominância apical (Fig.2 G). Neste tratamento se observou uma maior produção de calos na base das brotações, porém, sem afetar a produção e multiplicação de gemas e brotos. Em adição ao observado, alguns dos

explantes produziram brotações deformadas e com aspecto vítrico (dado não mostrado). A utilização de concentrações mais baixas da citocinina BAP ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no final da embriogênese, início do desenvolvimento, combinados com concentrações mais altas deste hormônio ( $0,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) na indução de multiplicação, a partir de nós cotiledonares, levam a uma pequena indução de gemas e brotos laterais, porém ainda mantém a dominância apical existente e uma provável inibição da indução de gemas e brotos laterais. A utilização de concentrações mais altas da citocinina BAP ( $1,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no final da embriogênese, início do desenvolvimento combinadas com concentrações mais baixas deste hormônio ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) na indução de multiplicação, a partir de nós cotiledonares, promovem uma maior indução de gemas e brotos. Entretanto quando combinadas com concentrações mais altas deste hormônio ( $0,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) há um aumento significativo na redução da dominância apical e um aumento na multiplicação de gemas e brotos laterais.

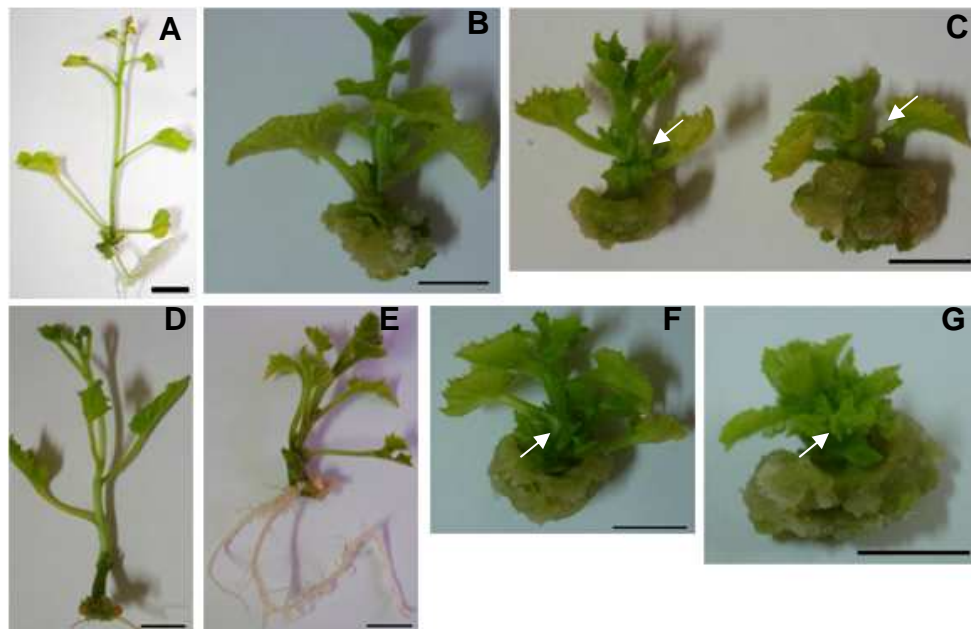


Figura 2. Multiplicação de tecidos para a produção de múltiplos brotos. A – Brotação principal oriunda do Tratamento 1. B – Brotação principal oriunda do tratamento 2. C - Brotação principal oriunda do tratamento 3. D – Brotação principal oriunda do tratamento 4. E – Brotação principal oriunda do tratamento 7. F - Brotação principal oriunda do tratamento 8. G – Brotação principal oriunda do tratamento 9. Flechas brancas (novas brotações laterais). A a G (Barra 1cm).

#### 4. Conclusão

Nó cotiledonar de meloeiro Cv. Gaúcho se mostrou eficiente para a obtenção de explantes com elevado potencial de multiplicação. No entanto, ainda se faz necessário a otimização do processo de alongamento dos brotos produzidos por estes explantes.

#### 5. Bibliografia

CARA, B., GIOVANNONI, J. J. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation **Plant Science**, Vol. 175, Issues 1-2, July-August 2008, Pages 106-113.

FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J. P. Climacteric and non-climacteric behavior in melon fruit: 2. Linking climacteric pattern and main postharvest disorders and decay in a set of near-isogenic lines. **Postharvest Biology and Technology**, Vol. 50, Issues 2-3, November 2008, Pages 125-134.

PECH, J.C., BOUZAYEN, M., LATCHÉ, A. Climacteric fruit ripening: Ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. **Plant Science**, Volume 175, Issues 1-2, July-August 2008, Pages 114-120.

ZHENG, X.Y., WOLFF, D.W. Ethylene production, shelf-life and evidence of RFLP polymorphisms linked to ethylene genes in melon (*Cucumis melo* L.), **Theor. Appl. Genet.** **101** (2000), pp. 613–624.